

**Untersuchungen zur Biosynthese
des Chlorophylls**

Dieter Steffens

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546706_0042

Untersuchungen zur Biosynthese des
Chlorophylls

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Dieter Steffens
aus
Bad Heilbrunn

1975



1. Berichterstatter: Prof.Dr. W. Rüdiger

2. Berichterstatter: Prof.Dr. W. Rau

Tag der mündlichen Prüfung: 15.5.1975

Vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger, meinem geschätzten Lehrer, danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes. Insbesondere aber danke ich ihm für die vertrauensvolle Zusammenarbeit, das stete Interesse am Fortgang der Arbeit und die vielen wertvollen Anregungen und Diskussionen.

Frau I. Blos danke ich für die Aufnahme der Massenspektren, sowie die gewissenhafte Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Versuche.

Bei Herrn H. Schießl möchte ich mich für die präzise Ausführung der Belichtungsapparaturen bedanken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Übersicht.....	1
I. Lichtabhängigkeit und Wirkungsspektrum der Phytolbildung.....	2-24
Einleitung.....	2
Material und Methodik.....	3
Ergebnisse.....	6
1. Gaschromatographie und Massenspektrometrie..	6
2. Phytolgehalt bei der Dunkelkeimung.....	10
Der Phytolgehalt von Getreidesaatgut.....	10
Der Phytolgehalt in keimendem Saatgut.....	10
3. Phytolsynthese unter Lichteinwirkung.....	12
Abhängigkeit von der Belichtungszeit.....	12
Einfluß einer Dunkelperiode nach Belichtung.	13
Das Wirkungsspektrum der Phytolsynthese.....	15
Diskussion.....	19
II. Hemmung der Phytolbildung durch Lävulinsäure. Einfluß des Phytochrom-Systems.....	24-37
Einleitung.....	24
Material und Methodik.....	25
Ergebnisse.....	26
1. Änderung des Pigmentgehaltes während der Keimung.....	26
2. Änderungen des Pigmentgehaltes etiolierter Kotyledonen unter Einwirkung von Lävulin- säure.....	27
3. Änderungen des Pigmentgehaltes "desetiolier- ter" Kotyledonen unter Einfluß von Lävulin- säure.....	29

	Seite
4. Der Einfluß von Lävulinsäure auf den Carotinoidgehalt.....	31
Diskussion.....	34
III. Die Wirkung von Aminotriazol auf die Bildung von Phytol und Carotinoiden.....	37-45
Einleitung.....	37
Material und Methodik.....	37
Ergebnisse.....	38
1. Wirkung von Aminotriazol auf die Bildung des Phytols.....	38
2. Wirkung von Aminotriazol auf die Carotinoid-synthese.....	41
Diskussion.....	43
Zusammenfassung der Ergebnisse.....	45
Literaturverzeichnis.....	47

Übersicht

Vorliegende Untersuchungen zur Biosynthese des Chlorophylls befassen sich in erster Linie mit der Biosynthese des Phytol-Anteils und der Frage nach deren Koordination mit der Synthese des Chlorophyllid-Restes.

Die Arbeit gliedert sich in drei Hauptabschnitte:

Im 1. Teil wird zunächst die Methodik zum Nachweis und zur Bestimmung kleinster Phytolmengen erläutert.

Daran schließen sich Untersuchungen zur Frage nach einer etwaigen Phytolsynthese im Dunkeln an.

Das Hauptaugenmerk gilt jedoch der Wirkung des Lichtes auf die Phytolsynthese. Dazu wurde der Einfluß der Belichtungszeit, Lichtintensität und einer Dunkelperiode nach vorangegangener Belichtung untersucht und schließlich das Wirkungsspektrum der Phytolsynthese mit dem der Protochlorophyllid-Umwandlung verglichen.

Im 2. Teil wird untersucht, ob die festgestellte Parallelität der Synthesen des Chlorophyllid- und Phytolanteils auf einer Regulation über den gemeinsamen Photorezeptor Protochlorophyllid beruht. Mit Hilfe eines Hemmstoffes der Porphyrin-ring-Synthese (Lävulinsäure) hofften wir den Regulator ausschalten zu können. Daneben wurde der Einfluß des Phytochrom-Systems auf die Phytolsynthese überprüft.

In einem 3. Teil wurde schließlich untersucht, ob sich die bei allen vorangegangenen Versuchen stets als parallel verlaufend erwiesenen Synthesen von Chlorophyllid und Phytol durch einen Hemmstoff der Isoprenoid-Synthese (Aminotriazol) entkoppeln lassen. Zur Kontrolle wurde der Einfluß von Aminotriazol auf die Synthese anderer Isoprenoide (Carotine) überprüft.

I. Lichtabhängigkeit und Wirkungsspektrum der Phytol- bildung

Einleitung

Die Biosynthese der Chlorophylle umfaßt zwei verschiedene Stoffwechselwege, die auf der Stufe von Chlorophyll a in- einander einmünden: Die letzte Stufe des Porphyrin-Weges ist dabei die photochemische Reduktion des Protochloro- phyllids zum Chlorophyllid a, für die die Lichtenergie vom Protochlorophyllid selbst absorbiert wird (Koski et al., 1951). Daran schließt sich die Veresterung mit Phytol an (Wolff und Price, 1957; Rüdiger, 1969; Treffry, 1970), das aus dem Isoprenoid-Stoffwechsel stammt (Fischer et al., 1962; Skilleter und Kekwick, 1970).

Seit der Beobachtung, daß in etiolierten Blättern kein (oder fast kein) Phytol enthalten ist, bei Belichtung aber sogar mehr davon gebildet wird, als es der gleichzeitig entstehenden Chlorophyllmenge entspricht (Fischer und Bohn, 1957), stellt sich die Frage, wie die Phytolsynthese durch das Licht reguliert und mit der Chlorophyllid-Synthese koordiniert wird.

Zahlreiche Arbeiten haben sich seitdem mit der Frage be- schäftigt, ob eine Dunkelsynthese des Phytols überhaupt möglich ist. Während mit papier- und dünnschichtchromato- graphischen Methoden in Dunkelkeimlingen kein Phytol ge- funden wurde (Fischer und Bohn, 1957; Hromatka et al., 1958; Fischer und Rüdiger, 1959; Skilleter und Kekwick, 1970), ergaben gaschromatographische Analysen kleine Phytolmengen (Liljenberg, 1971; Watts und Kekwick, 1974). Ob das als Dunkelsynthese gedeutet werden darf, ist nicht ganz sicher, da Phytol bereits in Gerstenkörnern (Bötsch,

1960) und Samen verschiedener Pflanzen (in Pflanzenölen nachgewiesen, Fischer und Bohn, 1957) vorkommt. Für eine Dunkelsynthese spricht der - allerdings nur geringe - Einbau markierter Vorstufen in Phytol ($^{14}\text{CO}_2$ bei grünen, ins Dunkle gebrachten Gerstenkeimlingen, Shlyk und Stanishevskaya, 1962; ^{14}C -Isopentenylpyrophosphat bei Homogenaten etiolierter Bohnenkeimlinge, Skilleter und Kekwick, 1970). Alle Autoren bestätigen jedoch die beträchtliche Steigerung der Phytolbildung im Weißlicht.

Um einen näheren Einblick in die Koordination von Phytol- und Chlorophyllid-Synthese zu erhalten, haben wir - ausgehend von Analysen des Saatgutes - in ergrünenden Keimlingen die Nettosynthese des Gesamt-Phytols mit der Nettosynthese des Chlorophylls und das Wirkungsspektrum der lichtabhängigen Phytolsynthese mit dem zugehörigen Wirkungsspektrum der Chlorophyllbildung verglichen.

Material und Methodik

Apparaturen zur Gaschromatographie und Massenspektrometrie:

Die Phytolbestimmungen wurden mit Hilfe eines Carlo Erba GI-Gaschromatographen durchgeführt. Die Auswertung der Gaschromatogramme erfolgte mittels eines automatischen Integrators (Autolab System IV) oder von Hand nach der Dreiecksmethode.

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen stand ein Jeol-Massenspektrometer (Type: JMS-D100) in Verbindung mit dem Jeol-Gaschromatographen (Type: JGC-20/K) zur Verfügung.

Pflanzenmaterial: Als Saatgut verwendeten wir Saathafer (Avena sativa L. Delphin) der Firma BayWa München, Sommer-Weizen (Triticum aestivum L. Kolibri) und Sommer-Gerste (Hordeum vulgare L.) von der Bayerischen Futter und

Saatbau Vereinigung GmbH München. Die Samen wurden in Plastikschalen auf Vermikulit ausgesät, mit Leitungswasser gegossen und dann in völliger Dunkelheit bei 25°C im Brutschrank gekeimt. Während des ganzen Keimprozesses wurde der Brutschrank nur 1-2 mal kurzzeitig zum Gießen geöffnet. Alle Arbeiten an den etiolierten Keimlingen wurden bei dunkelgrünem Sicherheitslicht (Brauner und Rau, 1966) durchgeführt.

Lösungsmittel: Alle zu Extraktions- und Lösungsvorgängen verwendeten Lösungsmittel wurden frisch destilliert und gaschromatographisch auf ihren Reinheitsgrad untersucht.

Belichtungseinrichtungen: Zur Belichtung mit Weißlicht verwendeten wir eine Leuchtröhreneinheit aus 4 Neonröhren (Philips TL 20W/29), die auf einer Fläche von 30x50 cm in 15 cm Entfernung eine einheitliche Helligkeit von 2000 Lux erzeugte.

Die zur Aufnahme von Dosis-Effekt-Kurven verwendete Beleuchtungseinrichtung entsprach im Wesentlichen der von Mohr und Schoser (1959) konstruierten Anlage.

Der Lichtstrahl wurde mit einem Spiegel so umgelenkt, daß die Belichtung der lebenden Keimlinge in einem voll klimatisierten Brutschrank von oben her erfolgen konnte. Um Streulicht auszuschalten, war der gesamte Strahlengang von einem schwarzen Tubus umgeben. Durch Drehung der Keimlingsschalen (Drehtisch mit 1 Umdrehung/Stunde) erfolgte eine möglichst gleichmäßige Belichtung.

Monochromatisches Licht definierter Wellenlängen wurde mit zwei verschiedenen Lichtquellen und Filtertypen erzeugt:

Bestrahlung mit den Wellenlängen 405/436/546/578 nm erfolgte mit einer Quecksilberlampe in deren Strahlengang

Monochromatfilter eingebracht wurden (Zubehör zum Spektralfluorometer DMR 21 der Fa. Zeiss). Die so erhaltenen Spektralbänder waren außerordentlich schmal und wiesen Halbwertsbreiten von 2-4 nm auf. Die Regulation der Lichtintensität erfolgte durch Änderung des Abstandes zwischen Lichtquelle und Objekt bzw. durch ein oder mehrere Blätter weißen Papiers, die in den Strahlengang zwischen Lichtquelle und Monochromatfilter eingebracht wurden.

Für die Wellenlängen 499/596/629/649/660/677/730 nm verwendeten wir als Lichtquelle einen Diaprojektor (Leitz Prado, 220V/500W), in dessen Strahlengang Interferenz-Linienfilter der Firma Schott mit Halbwertsbreiten zwischen 10 und 14 nm gebracht wurden. Die Interferenzfilter mußten durch ein spezielles Gebläse vor Überhitzung geschützt werden. Verschiedene Lichtintensitäten konnten durch Regulation der Betriebsspannung der Glühlampe eingestellt werden. Die Messung der Lichtintensität erfolgte mit einer Moll'schen Großflächenthermosäule Type E₁ in Verbindung mit einem Multiflex-Galvanometer Type MGF 0.

Pigmentbestimmungen: Für die Chlorophyll- und Phytolbestimmungen wurden jeweils 5 cm vom apikalen Ende des Primärblattes verwendet. Es wurde besonders darauf geachtet, daß dieser Teil während der Belichtung der Keimlinge nicht mehr von der Koleoptile umgeben war. Das Ernten, genaue Abwiegen (± 1 mg) und Extrahieren der Keimlinge erfolgte bei grünem Sicherheitslicht. Alle weiteren Aufarbeitungen wurden bei gedämpftem Tageslicht durchgeführt. Zur Chlorophyllbestimmung wurden die Keimlinge in einer vorgekühlten Reibschale mit etwas geglühtem Seesand, einer Spatelspitze Calciumkarbonat und wenig Aceton zu einem homogenen Brei verrieben und dann auf einer G₃-Filterfritte mit Aceton/Wasser (80:20) bis zur Farblosigkeit extrahiert. Das Eluat wurde im Meßkolben auf ein definiertes Volumen eingestellt und sofort am Spektralphotometer (DMR 22 der

Fa. Zeiss) zwischen 750 und 600 nm vermessen. Die Berechnung der Chlorophyll-Mengen erfolgte nach MacKinney (1941).

Zur Phytolbestimmung aus Keimlingsmaterial wurde die Extraktion in gleicher Weise, jedoch mit Methanol durchgeführt. Bei der Extraktion des Saatgutes mußte dieses zunächst im Mixer (Waring-blendor) mit Methanol zerkleinert und dann auf einer Nutsche solange extrahiert werden, bis das Eluat farblos war. Der Methanolextrakt wurde dann der alkalischen Hydrolyse unterworfen. Nach Zugabe von soviel festem KOH, daß man eine 2,5%ige Lösung erhält, wurde 30 Minuten bei 65-70°C am Rückfluß erhitzt, anschließend am Rotationsverdampfer auf etwa $\frac{1}{4}$ des Volumens eingeeengt und nach Zugabe einiger Tropfen Wasser mit Petroläther (40-55°) so oft ausgeschüttelt, bis der Auszug völlig farblos war. Die gesammelten Petrolätherauszüge wurden 3-4 mal mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, abgenutscht, am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt, schließlich wieder mit n-Hexan aufgenommen und in einem Meßkölbchen auf ein definiertes Volumen eingestellt.

Die quantitative Phytolbestimmung erfolgte nach einem von Liljenberg und Odham (1969) entwickelten und von uns etwas abgeänderten gaschromatographischen Verfahren (siehe Legende zu Abb. 1). Pro Bestimmung wurden mit einer 10 µl Spritze (Hamilton 701) jeweils 2 µl der Testlösung eingespritzt.

Ergebnisse

1. Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Als Trenn- und Bestimmungsmethode für Phytol diente uns die Gaschromatographie. Das von Ellsworth und Perkins (1966) angegebene Verfahren, bei dem das Phytol bei 250°C auf einer mit 20% Silikon (SF 96) belegten Säule dehydra-

tisiert und dann als Phytadien-Gemisch bestimmt wurde, erwies sich als zu unempfindlich und schlecht reproduzierbar. Die Angaben von Liljenberg und Odham (1969), daß das Phytol auf einer Glassäule mit 2% Hyprose (SP-80) auf Chromosorb W bei 155° ohne Zersetzung chromatographiert werden kann, konnten wir bestätigen. Durch Wahl einer längeren Glassäule, eines höheren Trägergasstromes und einer auf 167° erhöhten Säulentemperatur gelang es uns, die Retentionszeit zu verkürzen und eine höhere Empfindlichkeit zu erzielen. In 2 µl Testlösung konnten wir so noch 10⁻³ µg Phytol qualitativ und 0,005-3 µg quantitativ mit einer Genauigkeit von $\pm$ 5% erfassen. Ein typisches Chromatogramm eines Pflanzenextraktes zeigt Abb. 1.

Auch bei der von uns gewählten Temperatur tritt noch keine Wasserabspaltung zum Phytadien ein. Authentisches Phytadien (gewonnen nach Willstätter und Hocheder, 1907) gibt sich durch die kürzere Retentionszeit (Abb. 1) und sein Massenspektrum (Abb. 2) zu erkennen. Entscheidend ist, daß oberhalb des Peaks bei m/e 278 (M⁺) kein Signal mehr auftritt. Im Massenspektrum des Phytols (Abb. 3) findet man zwei etwa gleich starke Signale bei m/e 296 (M⁺) und m/e 278 (M⁺-18). Das Massenspektrum in Abb. 3, das zur Identifizierung von Phytol dient, das aus Saatgut gewonnen wurde, zeigt gleichzeitig, daß keine Wasserabspaltung während der Gaschromatographie auftritt: Das abgebildete, mit GC-MS-Kopplung aufgenommene Spektrum ist identisch mit dem durch Direkteinlaß von authentischen Phytol gewonnenen Massenspektrum (vgl. auch Liljenberg und Odham, 1969). Dagegen weisen die von Ellsworth und Nowak (1974) publizierten Massenspektren auf eine partielle Wasserabspaltung aus Phytol, Farnesol und anderen Isoprenoid-Alkoholen während der Gaschromatographie hin.

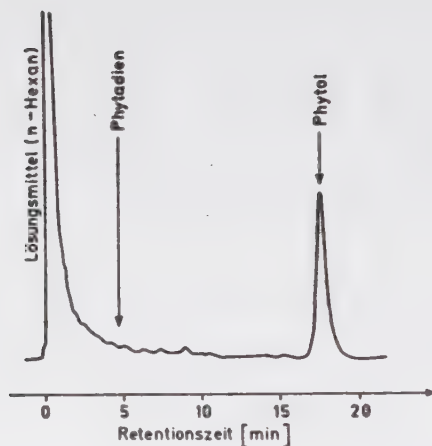


Abbildung 1: Gaschromatogramm des Unverseifbaren nach alkalischer Hydrolyse eines Extraktes teilweise ergrünter Haferkeime in n-Hexan bei 167°C. Die Peakfläche entspricht einer Phytolmenge von 0,027 µg. Die Retentionszeit von authentischem Phytadien (im Hydrolysat nicht enthalten) ist zum Vergleich angegeben.

Einspritzung: 2 µl Hexan
Säule: Glas, 3m x 3mm
Trägermaterial: Gas-Chrom Q; 150-200 µ
Belegung: 2% Hyprose 80
Trägergas: He; 80 ml/min
Detektor: FID; 170°C
Injektor: 170°C

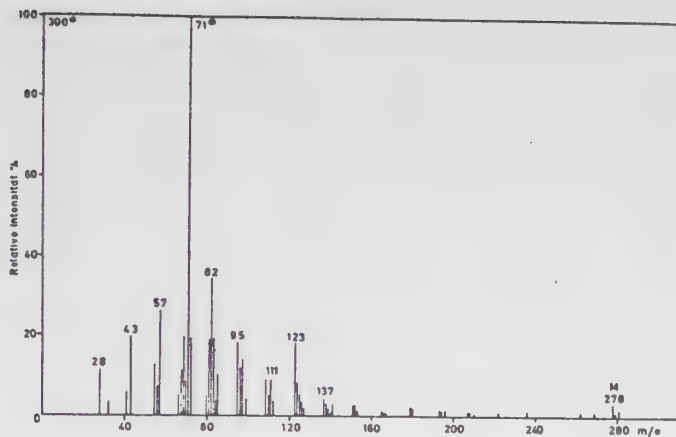


Abbildung 2: Massenspektrum von Phytadien; GC-MS-Kopplung;
GC: 2% Hyprose 80, 167°C; MS: 30 eV

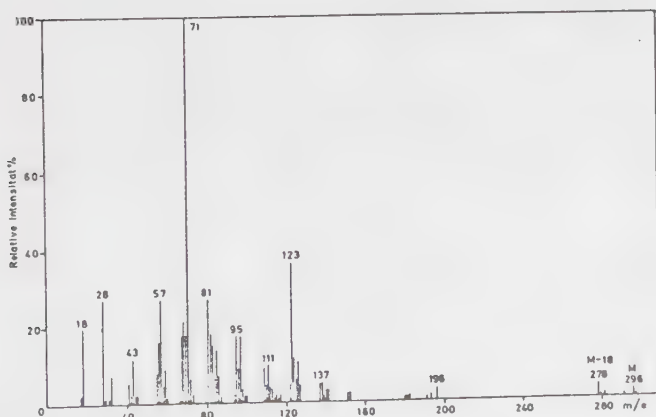


Abbildung 3: Massenspektrum von Phytol, das durch alkalische
Hydrolyse eines Methanolextraktes von Weizen-Karyopsen frei-
gesetzt wurde. GC-MS-Kopplung; GC: 2% Hyprose 30, 167°C;
MS: 30 eV

2. Phytolgehalt bei der Dunkelkeimung

Der Phytolgehalt von Getreide-Saatgut

In allen von uns untersuchten Getreidearten (Weizen, Hafer, Gerste) konnte Phytol nur nach alkalischer Hydrolyse des Rohextraktes nachgewiesen werden (Tabelle 1). Das heißt, daß der überwiegende Teil des in Samen vorhandenen Phytols gebunden vorliegt. Daß es sich bei dem durch Hydrolyse eines Körnerextraktes freigesetzten Alkohol wirklich um Phytol handelt, beweist neben der Retentionszeit in der Gaschromatographie das Massenspektrum (Abb. 3).

Der Phytolgehalt einer bestimmten Getreideart ist vom Alter, bzw. der Lagerzeit des Saatgutes abhängig. Frisches Saatgut enthält deutlich mehr Phytol als solches, das bereits ein Jahr gelagert wurde.

Tabelle 1: Gesamt-Phytolgehalt (nach alkalischer Hydrolyse) in frischem und gelagertem Saatgut

Saatgut	Phytolgehalt ($\mu\text{g/g}$)	
	frisch	1 Jahr gelagert
Hafer	2,3	1,7
Weizen	5,5	2,5
Gerste	4,8	—

Der Phytolgehalt in keimendem Saatgut

Wir ließen Weizen, der den größten Phytolgehalt aufweist, bei 25°C im Dunkeln keimen und untersuchten den Einfluß der Keimzeit auf den Phytolgehalt. Bei Keimzeiten bis zu 3 Tagen wurde das gesamte Pflanzenmaterial extrahiert. Bei

längeren Keimzeiten wurden Primärblatt und Koleoptile vom verbleibenden Rest der Pflanzen getrennt untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß der Phytolgehalt im gesamten Pflanzenmaterial mit fortschreitender Keimzeit abnimmt (Tabelle 2). Bereits nach 7 Tagen ist in dem verbleibenden Rest des Korns kein Phytol mehr nachweisbar. Eine entsprechende Zunahme des Gesamt-Phytols in Primärblatt und Koleoptile konnte nicht beobachtet werden. In 100 g 5 cm langen Spitzen der Primärblätter 6-8 Tage alter Keimlinge (ca. 3000 Pflanzen) wurden maximal 0,1 mg Phytol gefunden. Im gesamten Keimling (Primärblatt und Koleoptile) war maximal dieselbe Phytolmenge nachweisbar. Aus diesem Befund kann geschlossen werden, daß das Phytol etiolierter Keimlinge nur in dem gelben, apikalen Teil des Primärblattes lokalisiert ist. (Dieser Befund gilt auch für Hafer und Gerste).

Tabelle 2: Abnahme des Gesamt-Phytolgehaltes (nach alkalischer Hydrolyse) in frischem und gelagertem Weizen bei steigender Keimzeit. Die Werte sind jeweils auf 100 g des trockenen, ungekeimten Saatgutes bezogen (ca. 2500 Körner)

Keimzeit (Tagen)	Phytolgehalt (mg)	
	frisches Saatgut	gelagertes Saatgut
0	0,550	0,250
1	0,410	0,085
3	—	0,070
7 ¹⁾	0,100	0,005

¹⁾ Im Primärblatt nachgewiesen; in Koleoptile, Wurzel und verbleibendem Rest der Karyopse ist kein Phytol mehr nachweisbar.

3. Phytolsynthese unter Lichteinwirkung

Abhängigkeit von der Belichtungszeit

Um den zeitlichen Verlauf der Phytolsynthese während des Ergrünens zu beobachten, wurde Weizen 5 Tage bei völliger Dunkelheit gekeimt und dann weißem Dauerlicht (2000 Lux) ausgesetzt. Nach definierten Belichtungszeiten wurde gleichzeitig jeweils eine Chlorophyll- und Phytolbestimmung vorgenommen. Wie die Abb. 4 zeigt, verlaufen beide Synthesen parallel.

Nach einer zunächst langsamen Zunahme (lag-phase) folgt eine Phase raschen Anstiegs, die sich schließlich asymptotisch einem Maximalwert nähert. Aus diesem Vergleich der molaren Mengen ist gut ersichtlich, daß stets etwas mehr Phytol vorhanden ist, als es der gemessenen Chlorophyll-Menge entspricht. Solange ein deutlicher Anstieg beider Komponenten zu verzeichnen ist, nimmt auch der Phytolüberschuß zu, um dann konstant zu bleiben. Das Phytol weist also anfänglich eine etwas höhere Syntheserate auf als das gesamte Chlorophyll-Molekül. Der von uns gefundene Phytolüberschuß stimmt größenordnungsmäßig mit den von Fischer und Bohn (1957) gefundenen Werten überein.

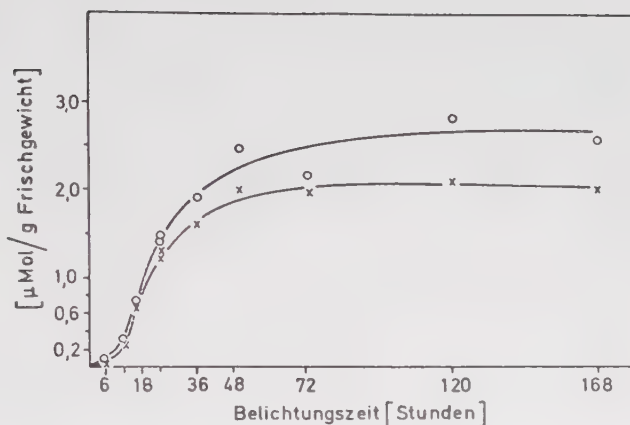


Abbildung 4: Chlorophyll- (X) und Phytol- (O) Akkumulation in 5 Tage alten, etiolierten Weizenkeimlingen bei Dauerbelichtung (Weißlicht 2000 Lux)

Einfluß einer Dunkelperiode nach Belichtung

Als nächstes sollte festgestellt werden, ob eine durch Licht einmal in Gang gesetzte Phytolsynthese auch in anschließender Dunkelheit fortgesetzt wird.

5 Tage alte, etiolierte Weizenkeimlinge wurden 12 Stunden mit Weißlicht (2000 Lux) bestrahlt (teilweises Ergrünen, vgl. Abb. 4) und anschließend wieder in völlige Dunkelheit versetzt. Die Dunkelperiode liegt in dem Zeitbereich, in dem bei kontinuierlicher Belichtung ein maximaler Anstieg im Chlorophyll- und Phytolgehalt zu erwarten gewesen wäre (vgl. Abb. 4). Die Chlorophyll- und Phytolbestimmungen erfolgten

wieder gleichzeitig.

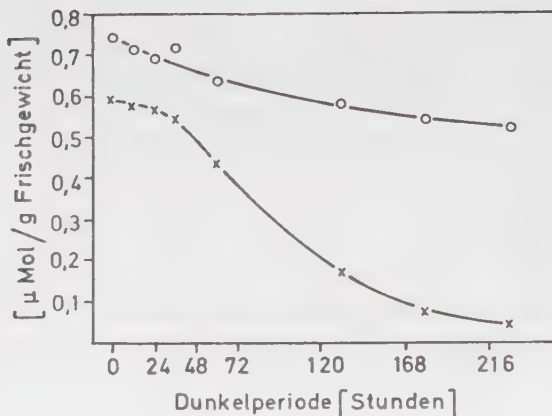


Abbildung 5: Chlorophyll- (X) und Phytolgehalt (O) in Abhängigkeit von der Dauer der Dunkelperiode: 5 Tage alte, etiolierte Weizenkeimlinge wurden zunächst 12 h belichtet (2000 Lux) und anschließend wieder völliger Dunkelheit ausgesetzt.

Wie Abb. 5 zeigt, wird mit einsetzender Dunkelheit nicht nur die Chlorophyll-Synthese, sondern auch die gesamte Phytolsynthese eingestellt. Während der Chlorophyllgehalt im Dunkeln zunächst (48 h) langsam, dann aber schnell abnimmt, erfolgt während der ganzen Versuchsdauer offensichtlich nur ein langsamer, gleichmäßiger Abbau des Phytols. Im Versuchszeitraum besitzt das Phytol also eine längere Lebensdauer als der Chlorophyllid-Rest. Nach etwa 10 Tagen kommt es zum völligen Zusammenbruch der Pflanzen. Bei Haferkeimlingen findet man dasselbe Ergebnis.

Das Wirkungsspektrum der Phytolsynthese

Zur Aufnahme von Dosis-Effekt-Kurven belichteten wir 8 Tage alte, etioliierte Haferkeimlinge 5 Stunden mit monochromatischem Licht definierter Wellenlängen in einem Intensitätsbereich von 0,05-2,5 W/m². Die Dosis-Effekt-Kurven wurden sowohl für die Phytol- als auch die Chlorophyll-Synthese aufgenommen, damit mögliche Unterschiede in der Reaktion beider Systeme erkannt werden konnten. In Abb. 6 sind 4 typische, von insgesamt 9 aufgenommenen Dosis-Effekt-Kurven abgebildet.

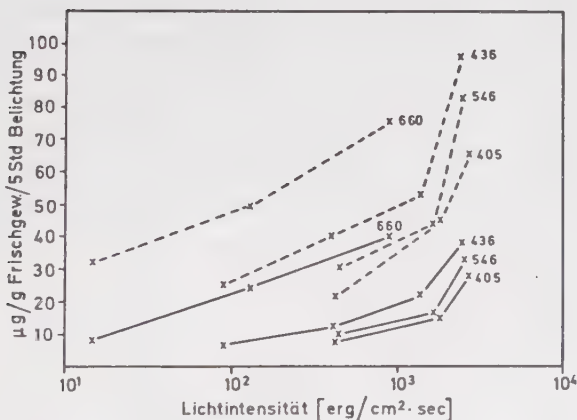


Abbildung 6: Chlorophyll- (—) und Phytolakkumulation (---) bei monochromatischem Licht in Abhängigkeit von der Lichtintensität. 8 Tage alte, etioliierte Haferkeimlinge wurden jeweils 5 h bei 25°C belichtet.

Die Kurven für die Chlorophyll-Synthese zeigten gute Übereinstimmung mit den von Raven (1973) gemachten Angaben. Wie

• 1 W/m² = 10³ erg/cm²·sec

aus Abb. 6 hervorgeht, liegt der gewählte Intensitätsbereich nicht nur für die Chlorophyllbildung, sondern auch für die des Phytols unterhalb des Sättigungsbereiches. Bei gleicher Wellenlänge haben die Dosis-Effekt-Kurven für die Chlorophyll- und Phytolsynthese einen entsprechenden Verlauf. Um eine etwaige Identität der Wirkungsspektren von Chlorophyll- und Phytolbildung zu verdeutlichen, haben wir das Molverhältnis Chlorophyll/Phytol aller Messungen gegen die Wellenlänge aufgetragen. Bei Identität der Wirkungsspektren müßte sich eine Gerade ergeben.

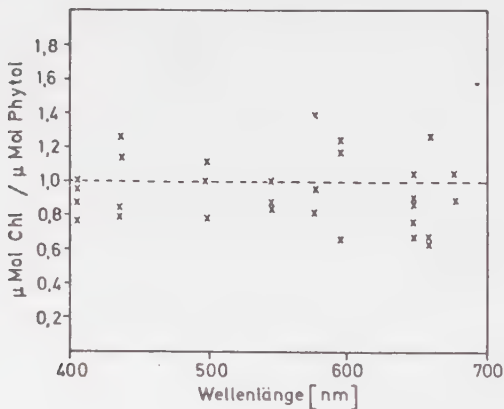


Abbildung 7: Das Molverhältnis Chl/Phytol in Abhängigkeit von der Wellenlänge.

8 Tage alte, etiolierte Haferkeimlinge wurden 5 Stunden bei 25°C mit monochromatischem Licht unterschiedlicher Intensität (0,05-2,5 W/m²) bestrahlt.

Statistischer Mittelwert: 0,945 ± 0,19

Abb. 7 vereinigt sämtliche Messungen, die bei den verschiedenen Wellenlängen und unterschiedlicher Lichtintensität durchgeführt wurden. Sie zeigt, daß alle Werte um einen Mittelwert streuen, der dicht beim Molverhältnis Chlorophyll/Phytol = 1 liegt. Eine Abhängigkeit des Chlorophyll/Phytol-Verhältnisses von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes ist nicht zu beobachten. Die bei den einzelnen Wellenlängen gemessenen Werte streuen um eine Gerade. Die mehr oder weniger starken Abweichungen vom statistischen Mittelwert sind in erster Linie darauf zurückzuführen, daß die einzelnen Meßpunkte einer definierten Wellenlänge den gesamten Intensitätsbereich von $0,05 - 2,5 \text{ W/m}^2$ umfassen. Wird dieser große Bereich in mehrere Intensitätsbereiche geringeren Umfangs gegliedert, so ist noch deutlicher zu erkennen, daß das Chlorophyll/Phytol-Verhältnis unabhängig von der Wellenlänge ist (Abb. 8). Man erhält für jeden Intensitätsbereich eine Gerade.

Das Wirkungsspektrum der Gesamt-Phytolsynthese ist also identisch mit dem der Chlorophyll-Synthese.

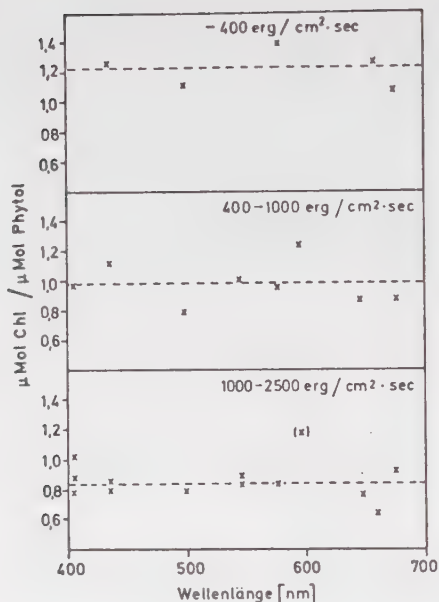


Abbildung 8: Einfluß der Lichtintensität auf das Molverhältnis Chl/Phytol nach 5 Stunden Dauerbelichtung mit monochromatischem Licht verschiedener Wellenlängen.

Statistische Mittelwerte: $-0,4 \text{ W/m}^2$ $1,22 \pm 0,13$
 $0,4-1,0 \text{ W/m}^2$ $0,99 \pm 0,14$
 $1,0-2,5 \text{ W/m}^2$ $0,83 \pm 0,09$

Aus Abb. 8 ergibt sich ferner, daß die Mittelwerte für das Chlorophyll/Phytol-Verhältnis in den verschiedenen Intensitätsbereichen nicht zur Deckung gebracht werden können. Ein Phytolüberschuß ist erst bei einer Lichtintensität $> 1,0 \text{ W/m}^2$ festzustellen.

Der bei den Messungen mit Weißlicht immer festgestellte Phytolüberschuß wird im monochromatischen Licht nur bei

hohen Intensitäten erreicht.

Diskussion

Zur Ermittlung der Nettosynthese des Phytols ist eine Methode erforderlich, die möglichst das gesamte, zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhandene Phytol erfaßt. Als geeignet befanden wir die alkalische Verseifung von Pflanzenextrakten. Im "Unverseifbaren" ist dann das Phytol enthalten, das vorher an Chlorophyll gebunden war (Hauptmenge!), sowie das als "Phytolüberschuß" in verschiedenen Pflanzen gefundene (Fischer und Bohn, 1957; Bötsch, 1960) und z.B. in spät-sommerlichen Buchenblättern als Phytolpalmitat (Bötsch, 1960), in Herbstblättern von Acer platanoides als Phytollinolenat (Csupor, 1970) charakterisiert worden war. Auch freies Phytol wird dabei mitbestimmt. Wir haben uns davon überzeugt, daß selbst kleine Mengen (0,3 mg Phytol auf 100 g Keime ergeben 0,03 µg pro Einspritzung) Phytol, die dem Pflanzenextrakt vor der Verseifung zugesetzt wurden, zu über 90% wiedergefunden wurden. Lediglich Phytolpyrophosphat (dargestellt nach der Methode von Cramer und Böhm, 1959) und Verbindungen vom Typ des Vitamins K₁¹⁾ liefern bei der Alkali-Hydrolyse erwartungsgemäß kein freies Phytol, wovon wir uns in Kontrollversuchen überzeugt haben. Diese Phytolverbindungen liegen bereits in etiolierten Blättern in geringer Menge vor; ihre Syntheserate im Licht ist aber 2-3 Zehnerpotenzen geringer als die des Chlorophylls (Watts und Kekwick, 1974; Lichtenthaler und Becker, 1975), so daß ihr Zuwachs bei der lichtabhängigen Nettosynthese des Phytols nicht ins Gewicht fällt.

Die Tatsache, daß in allen von uns untersuchten Samen Phytol

¹⁾ Für die Überlassung einer Probe von Vitamin K₁ danken wir Herrn Prof. Dr. H. K. Lichtenthaler, Karlsruhe

nachgewiesen werden konnte, bestätigt und ergänzt frühere Angaben über Phytol in Pflanzenölen (Fischer und Bohn, 1957), in Samenhäuten von Cucurbita pepo (Fischer und Rüdiger, 1959), in Gerstenkörnern (Bötsch, 1960) und in Samen von Nicotiana tabacum (Shimizu et al., 1964). Besonders viel Phytol ist in den Samen von Sinapis alba enthalten (Steffens et al., 1975). Es darf wohl angenommen werden, daß Phytol generell in Samen gespeichert wird. Da parallel mit der Samenreifung immer große Mengen Chlorophyll abgebaut werden, liegt die Vermutung nahe, daß dabei freigesetztes Phytol in die Samen eingelagert wird. Bekannt ist, daß der Chlorophyllid-Rest in Herbstblättern rascher abgebaut wird als der Phytol-Rest (Fischer und Bohn, 1957; Csupor, 1970). Das übriggebliebene Phytol wird dann offensichtlich mit Fettsäuren verestert. Wir finden auch in den Samen kein freies, sondern nur gebundenes Phytol.

Unterschiedliche Phytolmengen in verschiedenen Samen beruhen zwar in erster Linie auf artspezifischen Unterschieden; bei Vergleichen ist aber auch das Alter der Samen zu berücksichtigen. Die Abnahme des Phytolgehaltes bei der Lagerung von Getreidekörnern (Tabelle 2) zeigt, daß auch das Phytol dem Ruhestoffwechsel unterliegt.

Die von uns festgestellte Abnahme des Phytolgehaltes während der Dunkelkeimung kann neben einem Abbau auch einen Einbau von Phytol in von unserer Methode nicht erfaßte Phytylverbindungen bedeuten. Der bei der Dunkelkeimung von Raphanus sativus gefundene Anstieg an Vitamin K₁ und α -Tocopherol (Lichtenthaler und Becker, 1975) beweist also nicht zwingend eine Dunkelsynthese von Phytol. Eine geringe Dunkelsyntheserate, die z.B. durch den Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in das Phytol bei einem Homogenat etiolierter Keimlinge (Skilleter und Kekwick, 1970) bzw. bei grünen, in Dunkelheit gebrachte Pflanzen (Shlyk und Stanishevskaya, 1962)

wahrscheinlich gemacht wird, führt jedenfalls nicht zu einer Nettosynthese des Phytols im Dunkeln. Selbst während der maximalen Phytolsynthese beim Ergrünen etiolierter Keimlinge hört die Nettosynthese sofort auf, wenn die Pflanzen ins Dunkle gebracht werden (Abb. 5). Das bedeutet, daß auch durch Vorbelichtung keine meßbare, länger andauernde Dunkelsynthese des Phytols induziert werden kann.

Der erhöhte Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in das Phytol bei Belichtung (Fischer et al., 1962; Shlyk und Stanishevskaya, 1962; Skilleter und Kekwick, 1970) stimmt mit der Feststellung überein, daß eine Nettosynthese von Phytol erst im Licht erfolgt (diese Arbeit; vgl. Fischer und Bohn, 1957). Beim Ergrünen etiolierter Keimlinge im Dauer-Weißlicht findet man für die Phytolbildung denselben Verlauf (lag-phase, steiler Anstieg, Sättigungsbereich, vgl. Abb. 4), der bereits für die Chlorophyllbildung bekannt war (Gassman und Bogorad, 1967; Raven, 1973). Obwohl Chlorophyllid- und Phytolsynthese parallel verlaufen, lassen unsere Ergebnisse zunächst eine gewisse Unabhängigkeit der Phytolbildung von der Chlorophyllid-Akkumulation vermuten: Die Phytolbildung erfolgt nämlich unter diesen Versuchsbedingungen schneller als die des Chlorophyllid-Restes, d.h. es kommt zu einem Phytolüberschuß (Abb. 4). Da auch die Ausbildung dieses Phytolüberschusses eine lichtabhängige Reaktion ist, versuchten wir durch die Aufnahme des Wirkungsspektrums der Phytolsynthese Einblick in den Regulationsmechanismus zu erhalten.

Das Wirkungsspektrum für die Chlorophyll-Akkumulation im Dauerlicht weist auf das Zusammenwirken mehrerer lichtabhängiger Prozesse hin (Raven, 1972, 1973). Während bei niedrigen Lichtintensitäten die Photokonversion des Protochlorophyllids als limitierender Schritt angesehen werden darf (Raven, 1972), findet man in einem mittleren Intensitätsbereich ein von der Protochlorophyllid-Absorption ab-

weichendes Wirkungsspektrum, das auf das Zusammenwirken zweier Photorezeptoren (Protochlorophyllid, Phytochrom) zurückgeführt wurde (Raven, 1972, 1973). Die Phytochrom-Wirkung ist eindeutig erst bei Lichtsättigung der Protochlorophyllid-Chlorophyllid-Umwandlung zu erkennen (Mohr et al., 1974).

Wir finden nun, daß das Wirkungsspektrum der Phytolsynthese über einen weiten Intensitätsbereich hinweg mit dem der Chlorophyllid-Akkumulation identisch ist (Abb. 6,7,8). Phytol- und Chlorophyllid-Synthese laufen also immer parallel, d.h. sind in Bezug auf den Lichtbedarf streng gekoppelt. Da bei unseren Versuchen das gesamte, verseifbare Phytol erfaßt wurde, gilt das auch für das nicht im Chlorophyll gebundene Phytol. Ein übereinstimmendes Wirkungsspektrum für die lichtabhängige Carotinoidbildung in ergrünenden Erbsenkeimlingen (Raven, 1973) und Euglena gracilis (Wolken und Mellon, 1956) wurde ebenfalls beschrieben.

Der Einfluß des Phytochrom-Systems auf die Phytolbildung soll in einer getrennten Arbeit untersucht werden (Steffens et al., 1975). Für den Einfluß des Protochlorophyllids sehen wir zwei Möglichkeiten:

Phytol wird erst auf der Stufe des Chlorophyllids in das Pigment eingeführt (Rüdiger, 1969). Die photochemische Bildung des Chlorophyllids könnte daher zu einem äquivalenten Verbrauch von Phytol (bzw. einer Phytol-Vorstufe) führen und damit zu einer Neubildung des Phytols Anlaß geben. Da eine "feed-back"-Hemmung des Phytolpyrophosphats auf die Mevalonat-Kinase nachgewiesen wurde (Gray und Kekwick, 1973), wäre damit u.U. sogar ein Einfluß auf die Biosynthese anderer Isoprenoide (z.B. der Carotinoide) erklärbar. Die bei höheren Lichtintensitäten gefundenen Phytolüberschüsse (Abb. 8) sind mit einem derartigen Mechanismus allerdings nur zu erklären, wenn man annimmt, daß bereits bei den hier verwendeten Lichtintensitäten eine merkliche Photodestruktion

des Chlorophyllid-Restes (ohne gleichzeitige Zerstörung des Phytols) eintritt. Diese Photodestruktion mußte darüberhinaus auch noch bei allen verwendeten Wellenlängen gleich schnell ablaufen.

Attraktiver erscheint jedoch die Annahme, daß das Protochlorophyllid-Holochrom nicht nur die δ -Amino-lävulinsäure-Synthese und damit die Chlorophyllid-Bildung allosterisch hemmt (Mohr et al., 1974), sondern auch eine allosterische Hemmung eines Enzyms der Phytol- (und eventuell auch der Carotinoid-) Biosynthese bewirkt. Eine solche Hemmung würde durch die Phototransformation des Protochlorophyllid-Holochroms in Chlorophyllid-Holochrom sofort aufgehoben. Sie würde im Dunkeln entsprechend der Regeneration von Protochlorophyllid wieder eintreten. Wenn die (ungehemmte) Phytolsynthese schneller abläuft als die Chlorophyllid-Synthese und die Hemmung des Protochlorophyllids sich auf die Phytolbildung stärker auswirkt als auf die Chlorophyllidbildung, wäre die beobachtete Abhängigkeit des Chlorophyll/Phytol-Verhältnisses von der Lichtintensität zwanglos zu erklären. Da beide Biosynthesewege durch den jeweiligen Protochlorophyllid-Spiegel reguliert werden, muß das Chlorophyll/Phytol-Verhältnis bei gegebener Intensität unabhängig von der Wellenlänge sein.

II. Hemmung der Phytolbildung durch Lävulinsäure Einfluß des Phytochrom-Systems

Einleitung

Für die lichtabhängige Chlorophyllbildung haben wir neben der bereits lange bekannten Umwandlung des Protochlorophyllids in Chlorophyllid a eine Lichtabhängigkeit der Phytol-Biosynthese gezeigt (Steffens und Rüdiger, 1975). Beide Prozesse weisen dasselbe Wirkungsspektrum auf, werden also offensichtlich über einen gemeinsamen Photorezeptor (Protochlorophyllid) reguliert (Steffens und Rüdiger, 1975).

Um nähere Einzelheiten über diese Regulation zu erfahren, haben wir zwei Wege eingeschlagen:

Wir haben versucht, die Chlorophyllid-Synthese spezifisch zu hemmen und dabei die Phytolbildung zu messen. Als spezifischer Hemmstoff bot sich Lävulinsäure an, die als kompetitiver Inhibitor der ALA-Dehydratase wirkt und somit zu einer stark verminderten Porphyrin-Synthese (z.B. der Chlorophyllid-Synthese) bei gleichzeitiger Anreicherung von ALA führt (Beale, 1971; Harel und Klein, 1972; Schneider, 1973). Die Phytolbildung sollte hier nicht (oder zumindest nicht so stark wie die Chlorophyllidbildung) beeinträchtigt sein. Zur Kontrolle der Hemmstoffspezifität haben wir gleichzeitig die Bildung von Carotinoiden gemessen.

Getestet wurde ferner ein möglicher Einfluß des Phytochrom-Systems auf die Phytol-Biosynthese. Auch hier ist ein Einfluß auf die Chlorophyll-Biosynthese, besonders auf die "lag-phase" beim Ergrünen etiolierter Pflanzen bereits bekannt (Withrow, 1961; Virgin, 1961; Raven, 1972). H. Kasemir (1973) konnte zeigen, daß das Phytochrom bei Senfkeimlingen neben der Eliminierung der "lag-phase" eine Erhöhung der

Chlorophyll-Syntheserate bewirkt. Bei diesen Untersuchungen wurde offensichtlich angenommen, daß die Bildung des Chlorophyllid-Restes reguliert wird und daß für die Veresterung stets Phytol in ausreichendem Überschuß zur Verfügung steht. Die Feststellung der Lichtabhängigkeit der Phytolbildung veranlaßte uns zu untersuchen, ob über das Phytochrom-System neben der Chlorophyllid-Bildung auch die Phytolbildung reguliert wird.

Material und Methodik

Pflanzenmaterial, Anzucht und Belichtung entsprachen den von Mohr (1966) ausgearbeiteten Standardbedingungen. Saatgut (*Sinapis alba*) wurde von der Fa. Asgrow, Freiburg - Ebnet bezogen (Nachzucht 1972, Fraktion II). Die Anzucht erfolgte in Plexiglasbehältern bei 25°C im Dunkeln. Als DR-Quelle diente das Standard DR-Feld ($3,5 \text{ Wm}^{-2}$) nach Mohr (1966). Der zeitliche Verlauf der Chlorophyll-Akkumulation bei etiolierten und vorbelichteten Keimlingen wurde unter Standardbedingungen bei Weißlicht (7000 Lux) verfolgt (Kasemir, 1973). Lichtkeimung erfolgte ebenfalls im Brutschrank bei 25°C im Weißlicht (1500 Lux).

Inkubation: Die Inkubation wurde nach einer neu entwickelten Methode durchgeführt (Kasemir und Masoner, unveröffentlicht). Dabei übergießt man die Keimlinge im Dunkeln mit der Inkubationslösung, läßt sie 5 Minuten stehen und nach Abgießen der Lösung weitere 5 Minuten abtropfen. Die Belichtung mit Weißlicht erfolgt unmittelbar danach. Als Inkubationslösungen dienten: 1. Phosphatpuffer 10^{-2} M ; pH 7,0; 2. Lävulinsäure $8,5 \times 10^{-2} \text{ M}$ in 10^{-2} M Phosphatpuffer (1:1); pH 7,0.

Pigmentbestimmung: Hierzu wurden nur die Kotyledonen verwendet. Das zu bestimmende Pflanzenmaterial wurde zunächst

im Dunkeln (grünes Sicherheitslicht) unter Kühlung mit Methanol extrahiert. Nach Abnutschen durch eine G_3 -Filterfritte wurde der geklärte Extrakt auf ein definiertes Volumen eingestellt. Der größte Teil dieses Rohextraktes diente zur Phytolbestimmung, die nach einem modifizierten Verfahren von Liljenberg (1969) (Steffens und Rüdiger, 1975) durchgeführt wurde. Die Chlorophyll-Bestimmung erfolgte gemäß Steffens und Rüdiger (1975). Die Gesamt-Carotinoide konnten direkt aus dem Rohextrakt bestimmt werden (Steffens und Rüdiger, 1975), wobei die Höhe der Extinktionsmaxima zwischen 400 und 500 nm als Maß galten.

Ergebnisse

1. Änderung des Pigmentgehaltes während der Keimung

Die Samen von Sinapis alba enthalten in ihren Speicherkotyledonen verhältnismäßig große Mengen Phytol (42 $\mu\text{g}/50$ Kotyledonenpaare = 140 $\mu\text{g}/\text{g}$). In Getreidesaatgut wurde früher wesentlich weniger davon gefunden (Hordeum 4,8 $\mu\text{g}/\text{g}$). Im Extrakt trockener Samen von Sinapis alba war Chlorophyll a nur in äußerst geringen Mengen vorhanden (0,91 $\mu\text{g}/50$ Kotyledonenpaare).

Während der Dunkelkeimung wird der anfangs vorhandene "Phytol-pool" rasch abgebaut. Nach 60 Stunden konnten nur noch 11,7 $\mu\text{g}/50$ Kotyledonenpaare nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt ebenfalls mit vorangegangenen Untersuchungen an Getreidesaatgut überein (Steffens und Rüdiger, 1975).

Bei der Lichtkeimung setzt erst nach etwa 36 Stunden eine merkliche Chlorophyll-Synthese ein (Kasemir, 1973), die sich nach einer längeren Phase raschen Anstiegs asymptotisch dem Maximalwert nähert. Während des gesamten Ergrünungsprozesses

ist ein etwa gleichbleibender Phytolüberschuß festzustellen (Abb. 9). Der nach 36 Stunden Lichtkeimung gefundene Phytolwert liegt knapp über dem Ausgangswert und stellt, verglichen mit dem zu diesem Zeitpunkt noch sehr geringen Chlorophyllwert einen großen Phytolüberschuß dar.

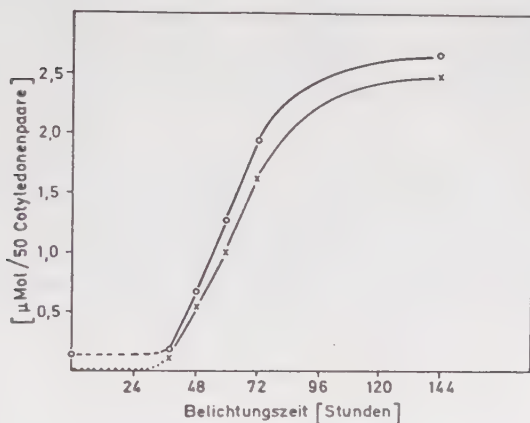


Abbildung 9: Synthese von Chlorophyll (X) und Phytol (O) in den Kotyledonen von Sinapis alba während der Keimung im Weißlicht (1500 Lux), 25°C.

2. Änderungen des Pigmentgehaltes etiolierter Kotyledonen unter Einwirkung von Lävulinsäure

Samen von Sinapis alba wurden 48 Stunden bei 25°C im Dunkeln unter Standardbedingungen gekeimt (Mohr, 1966), anschließend 5 Minuten mit Lävulinsäure bzw. Phosphatpuffer inkubiert und dann Weißlicht (7000 Lux) ausgesetzt.

Die Chlorophyll-Synthese folgt bei den pufferinkubierten Pflanzen dem zu erwartenden Verlauf mit "lag-phase" und anschließendem raschen Anstieg. Bei Inkubation mit Lävulinsäure wird die Chlorophyll-Synthese zu 96% gehemmt (Abb. 10). Diese Hemmung kann vermutlich nicht auf eine Schädigung der Keimlinge zurückgeführt werden. Jedenfalls ist während der Versuchsdauer (18 h) keine sichtbare Schädigung festzustellen. Allerdings scheint die physiologische Entwicklung stehen zu bleiben. Selbst nach einer Belichtungszeit von 18 Stunden unterschieden sich Lävulinsäure-behandelte Pflanzen im Habitus kaum von etiolierten Keimlingen vergleichbaren Alters.

Die Phytolsynthese läuft sowohl bei den Puffer-inkubierten Vergleichspflanzen, als auch bei den mit Lävulinsäure inkubierten Keimlingen der Chlorophyll-Synthese parallel. Der zu Versuchsbeginn vorhandene Phytolüberschuß wird während der gesamten Belichtungszeit aufrechterhalten.

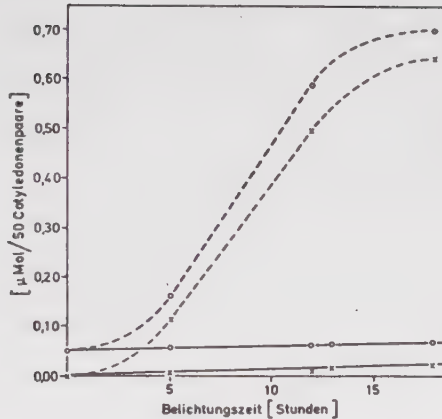


Abbildung 10: Synthese von Chlorophyll (X) und Phytol (O) in 48 Stunden alten, etiolierten Kotyledonen von Sinapis alba bei Bestrahlung mit Weißlicht (7000 Lux)

- a) - - - - nach Inkubation mit Phosphatpuffer (10^{-2} M, pH 7,0)
b) ——— nach Inkubation mit Lävulinsäure ($8,5 \times 10^{-2}$ M Lävulinsäure in 10^{-2} M Phosphatpuffer, 1:1, pH 7,0)

3. Änderungen des Pigmentgehaltes "desetiellierter" Kotyledonen unter Einfluß von Lävulinsäure

Keimlinge, die nach 24 Stunden Dunkelkeimung 36 Stunden mit DR vorbelichtet wurden, zeigen bei Pufferinkubation und nachfolgender Belichtung (WL 7000 Lux) einen sofortigen, linearen Anstieg im Chlorophyll-Gehalt, der den etiolierter

Keimlinge im Bereich schneller Chlorophyll-Akkumulation weit übertrifft (Kasemir, 1973).

Inkubation mit Lävulinsäure bewirkt auch hier eine Hemmung der Chlorophyll-Synthese. Der Anstieg im Chlorophyll-Gehalt ist ebenfalls linear, jedoch wesentlich geringer als bei den Vergleichswerten. Eine Gegenüberstellung der molaren Mengen Chlorophyll und Phytol zeigt in beiden Fällen einen parallelen Verlauf der Synthesen. Der zu Versuchsbeginn vorhandene Phytolüberschuß bleibt auch hier während der gesamten Versuchsdauer aufrechterhalten (Abb. 11).

Die auf Grund der DR-Vorbelichtung durch das Phytochrom induzierte, verstärkte Chlorophyll-Synthese wird also auch vom Phytol befolgt. Andererseits kommt es bei Hemmung der Chlorophyll-Synthese durch Lävulinsäure auch nicht zu einer vermehrten Phytolbildung, was auf eine strenge Kopplung beider Systeme hindeutet.

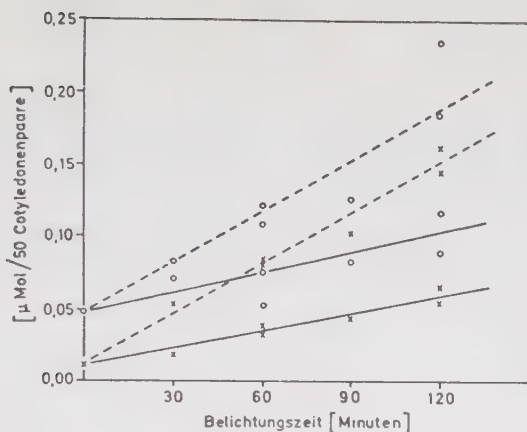


Abbildung 11: Synthese von Chlorophyll (X) und Phytol (O) in "desetiolierten" Kotyledonen von Sinapis alba (24 h D + 36 h DR) bei Bestrahlung mit Weißlicht (7000 Lux)

- a) - - - - nach Inkubation mit Phosphatpuffer
 b) ——— nach Inkubation mit Lävulinsäure

4. Der Einfluß von Lävulinsäure auf den Carotinoidgehalt

An Lävulinsäure-inkubierten Keimlingen wurde bei Belichtung eine unerwartete, zum Chlorophyllid parallel laufende Verminderung der Phytolsynthese festgestellt. Da der Syntheseweg des Phytols bis zur Stufe des Geranyl-Geranyl-Pyrophosphats mit dem der Carotinoide parallel verläuft (Rüdiger, 1969), könnte ein Einfluß der Lävulinsäure auch auf diese Stoffgruppe vermutet werden.

Die Kotyledonen etiolierter Senfkeimlinge enthalten spektral-photometrisch gut meßbare Carotinoid-Konzentrationen. Die

Messungen konnten direkt am Rohextrakt erfolgen, da wegen der äußerst geringen Chlorophyll-Mengen eine Störung der Extinktionsmessung im Bereich um 440 nm nicht zu befürchten war.

DR-Belichtung bewirkt einen, gegenüber der normalen Dunkelsynthese, deutlichen Anstieg im Carotinoidgehalt (Schnarrenberger und Mohr, 1970). Die pufferinkubierten, etiolierten und DR vorbelichteten Pflanzen zeigten im Weißlicht (7000 Lux) den gegenüber der Dunkel- bzw. DR-Syntheserate zu erwartenden Anstieg (vgl. Wolf, 1965; Virgin, 1966). Nach Inkubation mit Lävulinsäure steigt die Carotinoid-Synthese in etiolierten Keimlingen auch im Weißlicht nicht an, sondern läuft nur mit der Dunkelsynthese-Rate weiter (Tabelle 3) Die bei DR-Vorbelichtung zu beobachtende Steigerung der Chlorophyll- und Phytolsynthese konnte bei den Carotinoiden nicht festgestellt werden. Wir können daher annehmen, daß Lävulinsäure zumindest indirekt auch auf die Carotinoid-Synthese hemmend wirkt.

Tabelle 3: Der Carotinoidgehalt in den Kotyledonen von *Sinapis alba* unter Einfluß von Lävulinsäure

Keimzeit Vorbelichtung (Stunden)	Inkubation	Weißlicht (Stunden)	E ₄₄₀ (pro 100 Kot.Paare)
trockene Samen	—	—	0,045
48 D	—	—	0,160
60 D	—	—	0,220
24 D + 36 DR	—	—	0,430
"	LA 1)	2	0,440
"	P 1)	2	0,640
48 D	—	—	0,160
"	P	5	0,410
"	P	18	1,580
"	LA	5	0,168
"	LA	13	0,194
"	LA	18	0,210

1) Abkürzungen: LA = $8,5 \times 10^{-2}$ M Lävulinsäure in 10^{-2} M Phosphatpuffer, pH 7,0

P = 10^{-2} M Phosphatpuffer, pH 7,0

Diskussion

Die Abnahme im Phytolgehalt während der Dunkelkeimung bestätigt unsere früheren Befunde an Hafer und Weizen, wonach Phytol in Samen gespeichert wird und während des Keimprozesses wieder in den Stoffwechsel eingeht (Steffens und Rüdiger, 1975). Der größte Teil wird vermutlich zur Energiegewinnung abgebaut. Ein Teil des Phytols kann auch in andere Stoffe eingebaut (Vitamin K₁, Tocopherole) (Lichtenthaler und Becker, 1975) und damit unserem Nachweis entzogen werden (Steffens und Rüdiger, 1975). Bei Lichtkeimung dürfte der fast gleichbleibende Phytolgehalt während der ersten 36 Stunden durch eine Überlagerung von Abbau und Neusynthese zustande kommen. Auch der Phytolüberschuß, d.h. die Differenz von Gesamt-Phytol und dem mit Chlorophyll veresterten Phytol, bleibt während der Belichtung unter den verschiedenen Versuchsbedingungen gleich. Er entspricht jeweils der zu Versuchsbeginn vorhandenen Phytolmenge (vgl. Abb. 10 u. 11). Wir deuten diese Beobachtung so, daß das vor Beginn der Belichtung vorhandene Phytol nicht zur Chlorophyll-Synthese herangezogen wird und daher als unveränderter Phytolüberschuß erhalten bleibt.

Der Einfluß des Phytochrom-Systems auf lichtabhängige Biosynthesewege kann u.U. durch Dauer-DR-Belichtung etiolierter Keimlinge erkannt werden. Durch diese DR-Vorbelichtung wird zwar die lichtabhängige Biosynthese selbst noch nicht in Gang gesetzt, es wird aber ein P_{fr}-Spiegel eingestellt, der ausreicht, um die Enzyme zu induzieren, die bei anschließender Belichtung mit Weißlicht eine Steigerung der Syntheserate (gegenüber nicht vorbelichteten Pflanzen) bewirken. So wurde ein Einfluß des Phytochrom-Systems auf die lichtabhängige Chlorophyllsynthese (Kasemir, 1973) nachgewiesen. Unter diesen Versuchsbedingungen erweist sich nun auch die Phytolbildung als Phytochrom-gesteuerte Reaktion. Wie aus Abb. 11 hervorgeht, ist dieser Phytochrom-Effekt beim

Phytol der gleiche wie beim Chlorophyll, d.h. die Syntheserate des Alkohols und die des Pigments werden im gleichen Maße gesteigert.

Lävulinsäure hemmt die ALA-Dehydratase kompetitiv (Beale, 1971; Harel und Klein, 1972). Sie gilt daher als spezifischer Hemmstoff der Porphyrin-Biosynthese. Tatsächlich wurde bei Belichtung von Kotyledonen, die mit Lävulinsäure inkubiert worden waren, eine verminderte Chlorophyllbildung bei gleichzeitiger Anreicherung von δ -ALA gefunden (Schneider, 1973). Unter dem Einfluß der Lävulinsäure finden wir nun aber auch eine verminderte Phytolbildung, die unter verschiedenen Versuchsbedingungen stets der gehemmten Chlorophyllbildung parallel läuft (Abb. 10 u. 11). Das könnte auf eine Hemmung der Isoprenoid-Biosynthese zurückzuführen sein. Unter den gleichen Versuchsbedingungen finden wir nämlich auch eine Hemmung der Carotinoid-Biosynthese (Tabelle 3).

Daß die Lävulinsäure offensichtlich kein so spezifischer Hemmstoff ist, wie man früher annahm, geht auch aus Beobachtungen an den Sinapis-Keimlingen hervor. Selbst nach 18 stündiger Belichtung sind die inkubierten Pflanzen äußerlich kaum von etiolierten Pflanzen vergleichbaren Alters zu unterscheiden. D.h. die an intakten Pflanzen bei Belichtung nach kurzer Zeit feststellbaren Photomorphosen sind nicht zu beobachten. Eine Bildung sichtbarer Mengen Pigmente (Chlorophyll, Carotinoide, Anthocyane), die Öffnung bzw. Entfaltung der Blattspreiten oder die Orientierung nach dem Licht unterbleiben.

Es scheint besonders bemerkenswert, daß es sich bei allen beobachteten Phänomenen um Entwicklungsprozesse handelt, die durch das Phytochrom-System reguliert werden. Möglicherweise kommt es durch die Einwirkung der Lävulinsäure zu einer Funktionshemmung des Phytochroms. Allerdings dürfte diese Funktionshemmung sich nicht immer voll auswirken. So

ist bei Phytol- und Chlorophyllbildung auch mit Lävulinsäure noch ein fördernder Einfluß des Phytochrom-Systems erkennbar, wie sich aus dem Vergleich der Abb. 10 u. 11 ergibt.

Die Regulation von Chlorophyllid- und Phytolsynthese erweist sich nach diesen Untersuchungen als äußerst komplex. Wie schon in früheren Untersuchungen (Steffens und Rüdiger, 1975) wurde unter allen Versuchsbedingungen ein paralleler Verlauf von Porphyrin- und Phytol-Biosynthese festgestellt. Das Phytochrom-System fördert beide Biosynthesewege jeweils in gleichem Ausmaß. Daß auch in Gegenwart des Hemmstoffes Lävulinsäure stets beide Biosynthesewege in gleichem Ausmaß gehemmt wurden, ist überraschend. Die erwartete spezifische Hemmung der Chlorophyllidbildung (und damit ein erwarteter, relativer Phytolüberschuß) könnte deshalb nicht zu beobachten gewesen sein, weil offensichtlich auch die Isoprenoid-Bildung (neben anderen Prozessen) durch Lävulinsäure gehemmt wird. Das ergibt sich aus der drastischen Hemmung der lichtabhängigen Carotinoidbildung. Möglicherweise wird also auch die Phytolbildung durch Lävulinsäure direkt gehemmt. Die strenge Parallelität der Hemmung von Phytolbildung und Chlorophyllbildung spricht aber eher dafür, daß ein weiterer Regulationsfaktor existiert, der eine mit der Chlorophyllid-Synthese streng gekoppelte Phytolsynthese bewirkt.

III. Die Wirkung von Aminotriazol auf die Bildung von Phytol und Carotinoiden

Einleitung

Die lichtabhängige Bildung des gesamten verseifbaren Phytols in ergrünenden Keimlingen verläuft - unabhängig von der Wellenlänge des eingestrahltten Lichtes - parallel zur Bildung des Chlorophyllid-Restes (Steffens et al., 1975 a). Auch eine Erhöhung der Syntheserate durch Phytochrom und eine Hemmung durch Lävulinsäure betrifft das Phytol in gleicher Weise wie den Chlorophyllid-Rest (Steffens et al., 1975 b). Wir wollten nun wissen, ob diese Koordination durch Hemmung der Phytolsynthese aufgehoben werden kann.

Da ein spezifischer Hemmstoff der Phytolsynthese nicht bekannt ist, verwendeten wir das Herbizid 3-Amino-1,2,4-triazol (ATA). Dessen hemmende Wirkung auf die Chlorophyllbildung (Hall et al., 1954; Wolff, 1960) und die Plastidenentwicklung (Bartels, 1965; Bartels et al., 1967) im Licht führten Burns et al. (1971) auf eine primäre Hemmung der Carotinoid-Synthese zurück; beim Fehlen dieser Schutzpigmente soll es dann zu einer Photodestruktion des Chlorophylls sowie der Plastiden-Ribosomen und -Proteine kommen. Da eine solche primäre Hemmwirkung sich auch auf andere Isoprenoide erstrecken könnte, untersuchten wir den Einfluß von Aminotriazol auf die Phytolbildung; zum Vergleich wurden die Chlorophyll- und Carotinoid-Bildung gemessen.

Material und Methodik

Pflanzenmaterial, Anzucht und Belichtung: *Triticum aestivum*
(Sommer-Weizen Kolibri) von der Bayerischen Futter und

Saatbau GmbH wurde zunächst in völliger Dunkelheit 24 Stunden in 10^{-3} M ATA-Lösung bzw. Wasser gequollen (25°C) und nach 4tägiger Dunkelkeimung auf Vermikulit/Wasser ins Weißlicht (5000 Lux) gebracht (Steffens et al., 1975 a). Chlorophyll- und Phytolbestimmung erfolgten nach Steffens et al. (1975 a).

Zur Bestimmung der Carotinoide: wurden zunächst die gesamten lipoidlöslichen Pigmente aus der Methanol- in die Petroläther-Phase überführt (Zusatz von 10% wäßrigem NaCl). Der Petrolätherauszug wurde 3 mal mit Wasser gewaschen, mit etwas Na_2SO_4 getrocknet und auf 2 ml eingengt. Die Trennung der Pigmente erfolgte zunächst auf einer Stärkesäule (Hager, 1957). Die bei Entwicklung mit Petroläther ($40-60^{\circ}$) in der Lösungsmittelfront laufende gelbe Zone enthielt die gesamten Carotine. Die Carotin-Fraktion wurde auf einer $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Hyflo-Super-Gel-Säule (5:1) weiter getrennt (Bindl, 1968). Bei der Entwicklung mit Petroläther und steigenden Mengen Benzol erhielten wir 8 Zonen. Alle Fraktionen wurden zur Trockene eingengt und dann mit Petroläther bzw. Chloroform aufgenommen. Die Spektren wurden mit einem Spektralphotometer (DMR 22 der Fa. Zeiss) zwischen 320 und 540 nm aufgenommen (siehe Tab. 4).

Ergebnisse

1. Wirkung von Aminotriazol auf die Bildung des Phytols

Unter Einwirkung von Aminotriazol wird nicht nur die Chlorophyllbildung, sondern auch die gesamte Phytol-Biosynthese bei Belichtung etiolierter Weizenkeimlinge in charakteristischer Weise gehemmt (Abb. 12): Chlorophyll- und Phytolmengen steigen zunächst bis zu 24 h nach Einsetzen der Belichtung an, ohne jedoch die Kontrollwerte zu erreichen. Bei längerer Belichtung nimmt die Chlorophyllmenge in der behandelten Pflanze schnell, die Phytolmenge langsamer ab;

nach 10 - 12 Tagen (vollständiges Ausbleichen) gehen die Pflanzen dann ein. In den Kontrollpflanzen ist bis 48 h eine weitere Zunahme von Chlorophyll- und Phytolmenge und dann das Erreichen eines Plateaus zu beobachten.

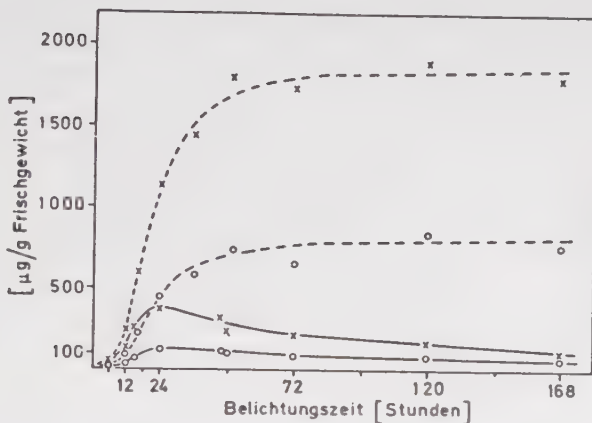


Abbildung 12: Vergleich der Synthese von Chlorophyll (X) und Phytol (O) in Aminotriazol-behandelten Weizenkeimlingen (—) und Kontrollpflanzen (---) bei Dauerbelichtung. Weizenkaryopsen wurden 24 h in 10^{-3} M ATA bzw. Wasser eingeweicht, 4 Tage auf Vermikulit/Wasser im Dunkeln gekeimt (25°C) und dann belichtet (WL 5000 Lux).

Ein Vergleich der molaren Mengen an Chlorophyll und Phytol zeigt, daß zunächst überwiegend die Phytol-Akkumulation betroffen ist (Abb. 13): Bis zu 40 h Belichtungszeit wird weniger Phytol gebildet, als es der gleichzeitig gebildeten Chlorophyllid-Menge entspricht ("Phytolmangel"). In diesem Zeitraum (z.B. nach 24 h Belichtungszeit) erhält man bei der

Dünnschichtchromatographie der Pigmente nach Riley u. Wilson (1965) neben den Zonen von Chlorophyll a und b zwei Zonen mit dem Elektronenspektrum von Chlorophyll a, die bei alkalischer Hydrolyse kein Phytol liefern, also phytolfrei sind. Die Pigmente lassen sich aus organischer Phase aber nicht mit Alkali extrahieren, sind also verestert. Bei längeren Belichtungszeiten bewirkt das, gegenüber der Abnahme der Phytolmenge, schnellere Verschwinden des Chlorophylls einen (relativen) Phytolüberschuß, der den, in ergrünenden Pflanzen stets vorhandenen Überschuß noch übertrifft (Abb.13).

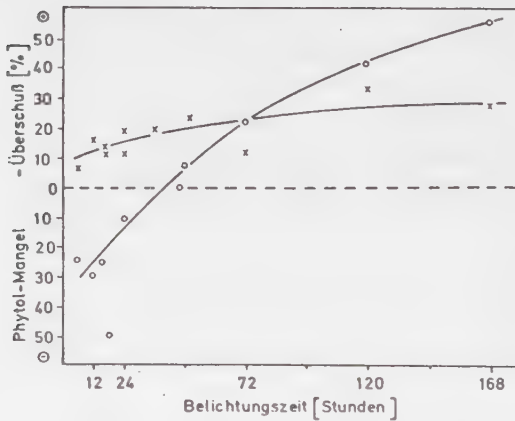


Abbildung 13: Phytolmangel bzw. -überschuß beim Ergrünen etiolierter Weizenkeimlinge in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. o-o: mit Aminotriazol; x-x: Kontrolliwerte mit Wasser. Versuchsbedingungen wie in Abb. 12.

2. Wirkung von Aminotriazol auf die Carotinoid-Synthese

Aminotriazol hat unter unseren Versuchsbedingungen keinen Einfluß auf die Carotinoid-Synthese im Dunkeln. So findet man in behandelten und Kontroll-Pflanzen nach gleicher Dunkelkeimzeit auch gleiche Carotinoidmengen. Die Spektren der Rohextrakte sind nach Lage und Höhe der Maxima identisch. Die Carotinfraktion besteht in beiden Fällen im Wesentlichen aus β -Carotin. Bei Belichtung steigt der Gehalt an Gesamt-Carotinoiden in den behandelten Pflanzen zunächst an, erreicht nach ca. 24 Stunden ein Maximum und fällt dann wieder ab. Der Carotinoidgehalt bleibt dabei immer unter den Kontrollwerten unbehandelter Pflanzen. Aminotriazol entfaltet also im Licht bei den Carotinoiden dieselbe Hemmwirkung wie bei Chlorophyll und Phytol. Das Verhältnis Gesamt-Chlorophyll/Gesamt-Carotine bleibt bei den Hemmversuchen stets konstant. Bei den Carotinen ergeben sich aber auch qualitative Änderungen, die sich bereits im Spektrum des Rohextraktes als stärkere Absorption bei 500 nm (Schulter) zu erkennen geben. Die Carotin-Fraktion besitzt Maxima bei 442, 467 und 498 nm, die gegenüber der Carotin-Fraktion von Kontrollpflanzen (425, 448 und 476 nm) zum langwelligen Spektralbereich verschoben sind. Die weitere Auftrennung dieser Fraktion ergibt 8 Komponenten, von denen 6 identifiziert wurden. (Tabelle 4). Hauptkomponente ist Lycopin. In der Carotin-Fraktion der Kontrollpflanzen ist nur β -Carotin nachweisbar.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Carotinfraction mit Aminotriazol behandelter Weizenkeimlinge

Fraktion	Pigment	Anteil (%)	Absorptionsmaxima (nm) in Petroläther gefunden	Literatur
1	Phytoflu	30,0	330/347/367,5	331/348/367 Davies (1961)
2	β -Carotin	12,9	425/450/478 438/465/495 1)	425/450/478 Jensen (1965) —/466/497 Goodwin 1) (1955)
3	ξ -Carotin	10,3	377/399/422	376/398/418 Jensen (1965)
4	nicht identifiziert	—	(400)/426/455/485	
5	γ -Carotin	7,7	434/459/490 448/474/507 1)	434/460/491 Jensen (1965) 447/475/508 Goodwin 1) (1955)
6	Neurosporin	4,5	415/439/468	414/439/466 Jensen (1965)
7	nicht identifiziert	—	439/465/496	
8	Lycopin	34,6	444/470/502 459/485/520 1)	443/472/504 Jensen (1962) 456/485/520 Goodwin 1) (1955)

1) in Chloroform

Diskussion

Die Hemmung der Carotinoid-Synthese durch ATA bei Weizenkeimlingen im Dunkeln (Burns et al., 1971) ist in Versuchen gefunden worden, in denen die Pflanzen während der gesamten Keimzeit (6 Tage) mit dem Hemmstoff behandelt wurden. Wenn wir die Karyopsen nur 24 h in der ATA-Lösung quellen und dann mit Wasser (ohne Hemmstoff) keimen ließen, war keine Hemmung der Carotinoid-Synthese im Dunkeln festzustellen. Die bei anschließender Belichtung dieser Pflanzen gefundene Hemmung der Carotinoid-Synthese, dürfte in erster Linie auf eine Blockierung der Zyklisierung zurückzuführen sein, da Lycopin Hauptbestandteil der Carotin-Fraktion ist (Tab. 4). Dagegen schlossen Burns et al. (1971) aus ihren Versuchen, daß ATA die Carotinoid-Synthese vor der Stufe von ζ -Carotin blockiert. Offensichtlich hemmt ATA die Carotinoid-Synthese auf mehreren Stufen, wobei sich der Schwerpunkt der Hemmwirkung je nach Versuchsbedingungen verschiebt.

Daß auch andere Isoprenoid-Synthesen durch ATA gehemmt werden können, zeigen unsere Messungen der Phytol-Akkumulation. Das Ausbleichen ATA-behandelter Pflanzen im Licht, das auf eine verstärkte Photooxidation des Chlorophylls bei Carotinoidmangel (Fehlen von Schutzpigmenten) zurückgeführt wurde (Burns et al., 1971), kann ebenso gut durch eine verstärkte Photooxidation des Blattgrüns bei Phytolmangel erklärt werden. Phytol schützt den Chlorophyllid-Rest offensichtlich vor einer Zerstörung durch Licht, da das veresterte Pigment bei Belichtung stabiler ist als das phytolfreie Chlorophyllid (Ziegler u. Schanderl, 1969). Allerdings geht der Chlorophyll-Abbau in ATA-behandelten Pflanzen nach kurzer Zeit bereits über das durch den Phytolmangel gesetzte Maß weit hinaus.

Die Koordination von Phytol- und Chlorophyll-Synthese wird durch ATA gestört. Die Hemmung der Phytolsynthese führt zu-

nächst zu einem Überschießen der Chlorophyllid-Bildung. Am anschließenden Rückgang der Chlorophyllid-Menge können neben der Photooxidation andere, durch ATA bewirkte Störungen (z.B. der Plastidenentwicklung, Bartels, 1965; Bartels et al., 1967) beteiligt sein.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Phytol wurde aus verschiedenem Pflanzenmaterial (Saatgut; etiolierte Keime; teilweise ergrünte Keimlinge) isoliert und sowohl gaschromatographisch als auch massenspektrometrisch identifiziert. Die Grenze der quantitativen Bestimmung lag bei 0,005 µg.
2. Die Achänen von Hafer (Avena sativa L.), Gerste (Hordeum vulgare L.) und Weizen (Triticum aestivum L.) enthalten "gebundenes" Phytol (2,3-5,5 µg). Ein Zusammenhang zwischen Alter (Lagerzeit) und Phytolgehalt wurde festgestellt. Der in den Samen des Senfs (Sinapis alba L.) gefundene Phytolgehalt ist vergleichsweise hoch (140 µg/g).
3. Während der Dunkelkeimung nimmt der Phytolgehalt ab. Eine Nettosynthese von Phytol ist im Dunkeln nicht zu beobachten.
4. Die bei Belichtung etiolierter Keimlinge (Hafer, Weizen, Senf) einsetzende Phytolsynthese läuft der Bildung des Chlorophyllid-Restes parallel. Bei längeren Belichtungszeiten kommt es zur Ausbildung eines Phytolüberschusses. Die in den Samen von Sinapis alba gefundene Phytolmenge bleibt auch in ergrünenden Keimlingen als Überschuß vorhanden.
5. In einer auf eine Belichtungsperiode (12 h) folgenden Dunkelperiode wird die Neusynthese des Phytols ebenso eingestellt, wie die des Chlorophyllid-Restes. Bei andauernder Dunkelheit wird das Phytol wesentlich langsamer abgebaut als der Chlorophyllid-Rest.
6. Das Wirkungsspektrum der Phytolsynthese ist in einem weiten Intensitätsbereich (0,05-2,5 W/m²) mit dem der Protochlorophyllid-Umwandlung identisch. Als gemeinsamer Photorezeptor wird das Protochlorophyllid angenommen.
7. Das Verhältnis von Chlorophyllid/Phytol nimmt unabhängig von der eingestrahnten Wellenlänge, mit steigender Lichtintensität ab.

8. Die Koordination der Chlorophyllid- und Phytolsynthese kann durch Einwirkung von Lävulinsäure (Hemmung der Porphyrinringsynthese) nicht gestört werden (Sinapis alba L.). Die Synthese des Phytols wird in gleichem Maße reduziert wie die des Chlorophyllid-Restes. Daneben ist eine deutliche Wirkung der Lävulinsäure auf die Carotinoid-Synthese sowie die lichtinduzierten Photomorphogenesen zu beobachten.
9. Das Phytochrom-System wirkt in etiolierten Keimlingen von Sinapis alba nach DR-Vorbelichtung auf die Akkumulation von Phytol in gleicher Weise fördernd wie auf die Chlorophyllid-Bildung.
10. Unter Einwirkung von Aminotriazol ist die Phytolsynthese etiolierter Weizenkeimlinge bei einsetzender Belichtung zunächst stärker gehemmt als die des Chlorophyllid-Restes. Bei Dauerbelichtung über längere Zeit wird das zunächst gebildete Chlorophyll abgebaut. Dabei erweist sich der Phytol-Rest als stabiler, so daß es zum Auftreten von Phytol-überschüssen kommt.
11. Aminotriazol hemmt unter den beschriebenen Versuchsbedingungen die Carotinsynthese bei Belichtung auf der Stufe des Lycopins, hat aber keinen Einfluß auf die Carotinoid-Synthese im Dunkeln.
12. Aus den vorgenannten Ergebnissen wird geschlossen, daß das Protochlorophyllid-Holochrom nicht nur die Chlorophyllid-Synthese allosterisch hemmt, sondern auch die Phytolsynthese auf einer noch unbekannten Stufe blockiert. Die gefundene Lichtabhängigkeit der Phytolsynthese wäre somit ein indirekter Effekt dieser Zusammenhänge.

Literatur

- Bartels, P.G.: Effect of amitrole on ultrastructure of plastids in seedlings. *Plant, Cell Physiol.* 6, 361-364 (1965)
- Bartels, P.G., Matsuda, K., Siegel, A., Weier, T.E.: Chloroplastic ribosome formation: Inhibition by 3-amino-1,2,4-triazole. *Plant Physiol.* 42, 736-741 (1967)
- Beale, S.I.: Studies on the biosynthesis and metabolism of δ -aminolevulinic acid in chlorella. *Plant Physiol.* 48, 316-319 (1971)
- Bindl, E.: Untersuchungen über den Verlauf der lichtabhängigen Carotinoidsynthese von Fusarium aquaeductum. Diss. Univ. München (1968)
- Bötsch, F.: Vorkommen und Bestimmung von Phytol. Diss. Univ. Würzburg (1960)
- Brauner, L., Rau, W.: Versuche zur Bewegungsphysiologie der Pflanzen. Berlin: Springer 1966
- Burns, E.R., Buchanan, G.A., Carter, M.C.: Inhibition of carotenoid synthesis as a mechanism of action of amitrole, dichlormate and pyrichlor. *Plant Physiol.* 47, 144-148 (1971)
- Cramer, F., Böhm, W.: Synthese von Geranyl- und Farnesylpyrophosphat. *Angew. Chemie* 71, 775 (1959)
- Csupor, L.: Das Phytol in vergilbten Blättern. *Planta Medica* 19, 37-41 (1970)
- Davies, B.H.: in: Chemistry and Biochemistry of plant pigments p. 518-519 T.W. Goodwin Academic Press, London, New York 1965
- Ellsworth, R.K., Perkins, H.I.: Gas chromatographic determination of phytol. *Anal. Biochem.* 17, 521-525 (1966)
- Ellsworth, R.K., Nowak, C.A.: A gas chromatographic - mass spectrometric analysis of the esterifying alcohols of pumpkin seed protochlorophylls. *Anal. Biochem.* 57, 534-546 (1974)

- Fischer, F.G., Bohn, H.: Über die Bildung und das Vorkommen von Phytol. Liebigs Ann. d. Chem. 611, 224-235 (1957)
- Fischer, F.G., Rüdiger, W.: Über den Phytolgehalt der Protochlorophylle und des im Dunkeln gebildeten Chlorophylls. Liebigs Ann. d. Chem. 627, 35-46 (1959)
- Fischer, F.G., Märkl, G., Hönel, H., Rüdiger, W.: Einbau von Essigsäure- und Mevalonsäure - (2-¹⁴C) in Chlorophyll, Sterine und Carotinoide von Gerstenkeimlingen. Liebigs Ann. d. Chem. 657, 199-212 (1962)
- Gassman, M., Bogorad, L.: Control of chlorophyll production in rapidly greening bean leaves. Plant Physiol. 42, 774-780 (1967)
- Goodwin, T.W.: In: Modern methods of plant analysis. vol. III 272, Heidelberg: Springer 1955
- Gray, I.C., Kekwick, R.G.O.: Mevalonat kinase in green leaves and etiolated cotyledons of the french bean Phaseolus vulgaris. Biochem. J. 133, 335-347 (1973)
- Hager, A.: Zur Chromatographie der lipoidlöslichen Blattfarbstoffe. Planta 48, 592-621 (1957)
- Hall, W.C., Johnson, S.P., Leinweber, C.L.: Aminotriazole - a new abscission chemical and growth inhibitor. Bull. 789, Texas Agr. Expt. Sta. 15 (1954)
- Harel, E., Klein, S.: Light dependent formation of δ - amino-levulinic acid in etiolated leaves of higher plants. Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 364-370 (1972)
- Hromatka, O., Stentzel, L.: Über die quantitative Bestimmung des Phytols. Mh. Chem. 89, 55 (1958)
- Jensen, L.: The constitution of some bacterial carotenoids and their bearing on biosynthetic problems. Trondheim 1962
- Jensen, L.: The fungal carotenoids and the natural distribution of Spirilloxanthin. Phytochem. 4, 925-931 (1965)
- Kasemir, H., Oberdorfer, U., Mohr, H.: A twofold action of phytochrome in controlling chlorophyll accumulation. Phytochem. Phytobiol. 18, 481-486 (1973)

- Koski, V.M., French, C.S., Smith, H.C.: The action spectrum for the transformation of protochlorophyll to chlorophyll a in normal and albino corn seedlings. Arch. Biochem. 31, 1-17 (1951)
- Lichtenthaler, H.K., Becker, K.: The influence of continuous far-red and wight light on prenyl chain synthesis in etioplasts of Raphanus seedlings. Planta (Berl.) in Vorbereitung (1975)
- Liljenberg, C., Odham, G.: Gas chromatographic determination of phytol in plant material. Physiol. Plant. 22, 686-693 (1969)
- Liljenberg, C.: Phytol changes in dark grown leaves of barley after varying light treatment. Physiol. Plant. 25, 358-362 (1971)
- MacKinney, G.: Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. 140, 315-322 (1941)
- Mohr, H., Schoser, G.: Eine Interferenzfilter-Monochromatoranlage für photobiologische Zwecke. Planta (Berl.) 53, 1-17 (1959)
- Mohr, H.: Untersuchungen zur phytochrominduzierten Photomorphogenese des Senfkeimlings (Sinapis alba L.) Z. Pflanzenphysiol. 54, 63-83 (1966)
- Mohr, H., Drumm, H., Kasemir, H.: Licht und Farbstoffe. Berichte der Deutschen Bot. Ges. 87, 49-69 (1974)
- Raven, C.W.: Synthesis of chlorophyll at different intensities of monochromatic light. Proc. IIInd Int. Congr. Photosyn. Res. Den Haag: Dr. W. Junk N. V. Publisher 1972
- Raven, C.W., Spruit, C.I.P.: Induction of rapid chlorophyll accumulation in dark grown seedlings. I. Action spectrum for pea. Acta Bot. Neerl. 21, 219-230 (1972)
- Raven, C.W., Spruit, C.I.P.: Induction of rapid chlorophyll accumulation in dark grown seedlings. II. Photo-reversibility. Acta Bot. Neerl. 21(6), 640- 654 (1972)
- Raven, C.W.: Chlorophyll formation and phytochrome. Meded. Landbouwhogeschool Wageningen 73-9, 1-108 (1973)

- Riley, J.P., Wilson, T.R.S.: The use of thin-layer chromatography for the separation and identification of phytoplankton pigments. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 45, 583-591 (1965)
- Rüdiger, W.: Biosynthese von Chlorophyllen. Chemiker-Ztg. 93, 664-668 (1969)
- Schnarrenberger, L., Mohr, H.: Carotenoid synthesis in mustard seedlings as controlled by phytochrome and inhibitors. Planta (Berl.) 94, 296-307 (1970)
- Schneider, H.A.W.: Licht- und entwicklungsbedingte Aktivitätsänderungen von vier aufeinander folgenden Enzymen der Porphyrin- und Chlorophyllbiosynthesekette. Z. Naturforsch. 28, 45-58 (1973)
- Shimizu, S., Fukushima, H., Tamaki, E.: Metabolism of chlorophyll in higher plants. I. Phytochem. 3, 641-645 (1964)
- Shlyk, A.A., Stanishevskaya, E.M.: The biosynthesis of phytol in the dark by green barley plants. Biokhimiya 27, 984-992 (1962)
- Skilleter, D.N., Kekwick, R.G.O.: Effect of light on the incorporation of isopentenyl pyrophosphate into phytol in the leaves of Phaseolus vulgare. Phytochem. 9, 153-156 (1970)
- Steffens, D., Rüdiger, W.: Untersuchungen zur Biosynthese des Chlorophylls. I. Lichtabhängigkeit und Wirkungsspektrum der Phytolbildung. in Vorbereitung (1975)
- Steffens, D., Kasemir, H., Rüdiger, W.: Untersuchungen zur Biosynthese des Chlorophylls. II. Hemmung der Phytolbildung durch Lävulinsäure. Einfluß des Phytochrom-Systems. in Vorbereitung (1975)
- Treffry, T.: Phytylation of chlorophyllide and prolamellar-body transformation in etiolated peas. Planta (Berl.) 91, 279-284 (1970)
- Virgin, H.I.: Chlorophyll biosynthesis and phytochrome action. in: Phytochrome ed. Mitrakos, K., Shropshire, Jr.W. London: Academic Press 1972, 369-404
- Virgin, H.I.: Carotenoid synthesis in leaves of wheat after irradiation by red light. Physiol. Plant. 19, 40-46 (1966)

- Watts, R.B., Kekwick, R.G.O.: Factors affecting the formation of phytol and its incorporation into chlorophyll by homogenates of the leaves of the french bean Phaseolus vulgaris. Arch. Biochem. Biophys. 160, 469-475 (1974)
- Willstätter, R., Hocheder, F.: Untersuchungen über Chlorophyll. III. Über die Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Chlorophyll. Liebigs Ann. Chem. 354, 205-258 (1907)
- Withrow, R.B., Wolff, I.B., Price, L.: Elimination of the lag-phase of chlorophyll biosynthesis in dark grown bean leaves by a pretreatment with low irradiations of monochromatic energy. Plant Physiol. 31 (Suppl.) XIII (1956)
- Wolff, I.B., Price, L.: Terminal steps of chlorophyll a biosynthesis in higher plants. Arch. of Biochem. Biophys. 72, 293-301 (1957)
- Wolf, F.T.: Influence of amino triazole on the chloroplast pigments of wheat seedlings. Nature. 188, 164-165 (1960)
- Wolf, F.T.: Effects of light and darkness on biosynthesis of carotenoid pigments in wheat seedlings. Plant Physiol. 38, 649-652 (1963)
- Wolken, I.I., Mellon, A.D.: The relationship between chlorophyll and the carotenoids in the algal flagellate, Euglena. J. Gen. Physiol. 39, 675-685 (1956)
- Ziegler, R., Schanderl, S.H.: Chlorophyll degradation and the kinetics of dephytylated derivatives in a mutant of Chlorella. Photosynthetica 3, 45-54 (1969)

Lebenslauf

Am 26. Mai 1945 kam ich, Dieter Steffens, als Sohn des Elektroingenieurs Kurt Steffens und dessen Ehefrau Annemarie, geb. Müller in Bad Tölz zur Welt.

Von 1951 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Bad Heilbrunn und anschließend bis 1965 die Oberrealschule Bad Tölz.

Im Oktober 1965 wurde ich zur Bundeswehr einberufen. Nach zweijähriger Dienstzeit schied ich im September 1967 als Fähnrich der Reserve wieder aus.

Mit dem Wintersemester 1967/68 begann ich das Studium der Chemie und Biologie für das Lehramt an Gymnasien an der Ludwig-Maximilians-Universität München, das ich im Frühjahr 1972 mit dem Staatsexamen abschloß.

Seit Juli 1972 arbeite ich unter Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München an der vorliegenden Dissertation. Während dieses Zeitraums bezog ich ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz.

Am 3. Februar 1975 trat ich am Gisela Gymnasium in München eine Stelle als Studienreferendar für die Fächer Chemie und Biologie an.

